**第十章 DNA的生物合成**

一、遗传学的中心法则和反中心法则：

DNA通过复制将遗传信息由亲代传递给子代；通过转录和翻译，将遗传信息传递给蛋白质分子，从而决定生物的表现型。DNA的复制、转录和翻译过程就构成了遗传学的中心法则。但在少数RNA病毒中，其遗传信息贮存在RNA中。因此，在这些生物体中，遗传信息的流向是RNA通过复制，将遗传信息由亲代传递给子代；通过反转录将遗传信息传递给DNA，再由DNA通过转录和翻译传递给蛋白质，这种遗传信息的流向就称为反中心法则。

二、DNA复制的特点：

1．半保留复制：DNA在复制时，以亲代DNA的每一股作模板，合成完全相同的两个双链子代DNA，每个子代DNA中都含有一股亲代DNA链，这种现象称为DNA的半保留复制(semiconservative replication)。DNA以半保留方式进行复制，是在1958年由M. Meselson 和 F. Stahl 所完成的实验所证明。

2．有一定的复制起始点：DNA在复制时，需在特定的位点起始，这是一些具有特定核苷酸排列顺序的片段，即复制起始点（复制子）。在原核生物中，复制起始点通常为一个，而在真核生物中则为多个。

3．需要引物(primer)：DNA聚合酶必须以一段具有3'端自由羟基（3'-OH）的RNA作为引物，才能开始聚合子代DNA链。RNA引物的大小，在原核生物中通常为50～100个核苷酸，而在真核生物中约为10个核苷酸。

4．双向复制：DNA复制时，以复制起始点为中心，向两个方向进行复制。但在低等生物中，也可进行单向复制。

5．半不连续复制：由于DNA聚合酶只能以5'→3'方向聚合子代DNA链，因此两条亲代DNA链作为模板聚合子代DNA链时的方式是不同的。以3'→5'方向的亲代DNA链作模板的子代链在聚合时基本上是连续进行的，这一条链被称为领头链(leading strand)。而以5'→3'方向的亲代DNA链为模板的子代链在聚合时则是不连续的，这条链被称为随从链(lagging strand)。DNA在复制时，由随从链所形成的一些子代DNA短链称为冈崎片段(Okazaki fragment)。冈崎片段的大小，在原核生物中约为1000～2000个核苷酸，而在真核生物中约为100个核苷酸。

三、DNA复制的条件：

1．底物：以四种脱氧核糖核酸(deoxynucleotide triphosphate)为底物，即dATP，dGTP，dCTP，dTTP。

2．模板(template)：以亲代DNA的两股链解开后，分别作为模板进行复制。

3．引发体(primosome)和RNA引物(primer)：引发体由引发前体与引物酶（primase）组装而成。引发前体是由若干蛋白因子聚合而成的复合体；引物酶本质上是一种依赖DNA的RNA聚合酶（DDRP）。

4．DNA聚合酶（DNA dependent DNA polymerase, DDDP）：

⑴种类和生理功能：在原核生物中，目前发现的DNA聚合酶有三种，分别命名为DNA聚合酶Ⅰ（pol Ⅰ），DNA聚合酶Ⅱ（pol Ⅱ），DNA聚合酶Ⅲ（pol Ⅲ），这三种酶都属于具有多种酶活性的多功能酶。pol Ⅰ为单一肽链的大分子蛋白质，具有5'→3'聚合酶活性、3'→5'外切酶活性和5'→3'外切酶的活性；其功能主要是去除引物、填补缺口以及修复损伤。pol Ⅱ具有5'→3'聚合酶活性和3'→5'外切酶活性，其功能 不明。pol Ⅲ是由十种亚基组成的不对称二聚体，具有5'→3'聚合酶活性和3'→5'外切酶活性，与DNA复制功能有关。

在真核生物中，目前发现的DNA聚合酶有五种。其中，参与染色体DNA复制的是pol α（延长随从链）和pol δ（延长领头链），参与线粒体DNA复制的是pol γ，polε与DNA损伤修复、校读和填补缺口有关，pol β只在其他聚合酶无活性时才发挥作用。

⑵DNA复制的保真性：为了保证遗传的稳定，DNA的复制必须具有高保真性。DNA复制时的保真性主要与下列因素有关：①遵守严格的碱基配对规律；②在复制时对碱基的正确选择；③对复制过程中出现的错误及时进行校正。

5．DNA连接酶(DNA ligase)：DNA连接酶可催化两段DNA片段之间磷酸二酯键的形成，而使两段DNA连接起来。该酶催化的条件是：① 需一段DNA片段具有3'-OH，而另一段DNA片段具有5'-Pi基；② 未封闭的缺口位于双链DNA中，即其中有一条链是完整的；③ 需要消耗能量，在原核生物中由NAD+供能，在真核生物中由ATP供能。

6．单链DNA结合蛋白（single strand binding protein, SSB）：又称螺旋反稳蛋白（HDP）。这是一些能够与单链DNA结合的蛋白质因子。其作用为：①稳定单链DNA，便于以其为模板复制子代DNA；② 保护单链DNA，避免核酸酶的降解。

7．解螺旋酶（unwinding enzyme）：又称解链酶或rep蛋白，是用于解开DNA双链的酶蛋白，每解开一对碱基，需消耗两分子ATP。

8．拓扑异构酶(topoisomerase)：拓扑异构酶可将DNA双链中的一条链或两条链切断，松开超螺旋后再将DNA链连接起来，从而避免出现链的缠绕。

四、DNA生物合成过程：

1．复制的起始：

⑴预引发：①解旋解链，形成复制叉：由拓扑异构酶和解链酶作用，使DNA的超螺旋及双螺旋结构解开，形成两条单链DNA。单链DNA结合蛋白（SSB）结合在单链DNA上，形成复制叉。DNA复制时，局部双螺旋解开形成两条单链，这种叉状结构称为复制叉。②引发体组装：由引发前体蛋白因子识别复制起始点，并与引发酶一起组装形成引发体。

⑵引发：在引发酶的催化下，以DNA链为模板，合成一段短的RNA引物。

2．复制的延长：

⑴聚合子代DNA：由DNA聚合酶催化，以亲代DNA链为模板，从5'→3'方向聚合子代DNA链。

⑵引发体移动：引发体向前移动，解开新的局部双螺旋，形成新的复制叉，随从链重新合成RNA引物，继续进行链的延长。

3．复制的终止：

⑴去除引物，填补缺口： RNA引物被水解，缺口由DNA链填补，直到剩下最后一个磷酸酯键的缺口。

⑵连接冈崎片段：在DNA连接酶的催化下，将冈崎片段连接起来，形成完整的DNA长链。

⑶真核生物端粒（telomere）的形成：端粒是指真核生物染色体线性DNA分子末端的结构部分，通常膨大成粒状。线性DNA在复制完成后，其末端由于引物RNA的水解而可能出现缩短。故需要在端粒酶（telomerase）的催化下，进行延长反应。端粒酶是一种RNA-蛋白质复合体，它可以其RNA为模板，通过逆转录过程对末端DNA链进行延长。

五、DNA的损伤：

由自发的或环境的因素引起DNA一级结构的任何异常的改变称为DNA的损伤。常见的DNA的损伤包括碱基脱落、碱基修饰、交联，链的断裂，重组等。引起DNA损伤的因素有：

1．自发因素：

(1)自发脱碱基：由于N-糖苷键的自发断裂，引起嘌呤或嘧啶碱基的脱落。

(2)自发脱氨基：C自发脱氨基可生成U，A自发脱氨基可生成I。

(3)复制错配：由于复制时碱基配对错误引起的损伤。

2．物理因素：由紫外线、电离辐射、X射线等引起的DNA损伤。其中，X射线和电离辐射常常引起DNA链的断裂，而紫外线常常引起嘧啶二聚体的形成，如TT，TC，CC等二聚体。

3．化学因素：

(1)脱氨剂：如亚硝酸与亚硝酸盐，可加速C脱氨基生成U，A脱氨基生成I。

(2)烷基化剂：这是一类带有活性烷基的化合物，可提供甲基或其他烷基，引起碱基或磷酸基的烷基化，甚至可引起邻近碱基的交联。

(3)DNA加合剂：如苯并芘，在体内代谢后生成四羟苯并芘，与嘌呤共价结合引起损伤。

(4)碱基类似物：如5-FU，6-MP等，可掺入到DNA分子中引起损伤或突变。

(5)断链剂：如过氧化物，含巯基化合物等，可引起DNA链的断裂。

六、DNA突变的类型：

1．点突变：转换——相同类型碱基的取代。颠换——不同类型碱基的取代。插入——增加一个碱基。缺失——减少一个碱基。

2．复突变：插入—— 增加一段顺序。缺失—— 减少一段顺序。倒位—— 一段碱基顺序发生颠倒。易位—— 一段碱基顺序的位置发生改变。重组—— 一段碱基顺序与另一段碱基顺序发生交换。

七、DNA突变的效应：

1．同义突变：基因突变导致mRNAMM子第三位碱基的改变但不引起MM子意义的改变，其翻译产物中的氨基酸残基顺序不变。

2．误义突变：基因突变导致mRNAMM子碱基被置换，其意义发生改变，翻译产物中的氨基酸残基顺序发生改变。

3．无义突变：基因突变导致mRNAMM子碱基被置换而改变成终止暗码子，引起多肽链合成的终止。

4．移码突变：基因突变导致mRNAMM子碱基被置换，引起突变点之后的氨基酸残基顺序全部发生改变。

八、DNA损伤的修复：

DNA损伤的修复方式可分为直接修复和取代修复两大类。直接修复包括光复活、转甲基作用和直接连接作用，均属于无差错修复。取代修复包括切除修复、重组修复和SOS修复，后二者属于有差错倾向修复。

1．光复活：由光复活酶识别嘧啶二聚体并与之结合形成复合物，在可见光照射下，酶获得能量，将嘧啶二聚体的丁酰环打开，使之完全修复。

2．转甲基作用：在转甲基酶的催化下，将DNA上的被修饰的甲基去除。此时，转甲基酶自身被甲基化而失活。

3．直接连接：DNA断裂形成的缺口，可以在DNA连接酶的催化下，直接进行连接而封闭缺口。

4．切除修复：这种修复机制可适用于多种DNA损伤的修复。该修复机制可以分别由两种不同的酶来发动，一种是核酸内切酶，另一种是DNA糖苷酶。①特异性的核酸内切酶（如原核中的UvrA、UvrB和UvrC）或DNA糖苷酶识别DNA受损伤的部位，并在该部位的5'端作一切口；②由核酸外切酶（或DNA聚合酶Ⅰ）从5'→3'端逐一切除损伤的单链；③在DNA聚合酶的催化下，以互补链为模板，合成新的单链片段以填补缺口；④由DNA连接酶催化连接片段，封闭缺口。

5．重组修复：①DNA复制时，损伤部位导致子链DNA合成障碍，形成空缺；②此空缺诱导产生重组酶（重组蛋白RecA），该酶与空缺区结合，并催化子链空缺与对侧亲链进行重组交换；③对侧亲链产生的空缺以互补的子链为模板，在DNA聚合酶和连接酶的催化下，重新修复缺口；④亲链上的损伤部位继续保留或以切除修复方式加以修复。

6．SOS修复：这是一种在DNA分子受到较大范围损伤并且使复制受到抑制时出现的修复机制，以SOS借喻细胞处于危急状态。

**第十一章 RNA的生物合成**

一、RNA转录合成的特点：

在RNA聚合酶的催化下，以一段DNA链为模板合成RNA，从而将DNA所携带的遗传信息传递给RNA的过程称为转录。经转录生成的RNA有多种，主要的是rRNA，tRNA，mRNA，snRNA和HnRNA。

1．转录的不对称性：指以双链DNA中的一条链作为模板进行转录，从而将遗传信息由DNA传递给RNA。对于不同的基因来说，其转录信息可以存在于两条不同的DNA链上。能够转录RNA的那条DNA链称为有意义链（模板链），而与之互补的另一条DNA链称为反意义链（编码链）。

2．转录的连续性：RNA转录合成时，在RNA聚合酶的催化下，连续合成一段RNA链，各条RNA链之间无需再进行连接。

3．转录的单向性：RNA转录合成时，只能向一个方向进行聚合，RNA链的合成方向为5'→3'。

4．有特定的起始和终止位点：RNA转录合成时，只能以DNA分子中的某一段作为模板，故存在特定的起始位点和特定的终止位点。

二、RNA转录合成的条件：

1．底物：四种核糖核苷酸，即ATP，GTP，CTP，UTP。

2．模板：以一段单链DNA作为模板。

3．RNA聚合酶（DDRP）： RNA聚合酶在单链DNA模板以及四种核糖核苷酸存在的条件下，不需要引物，即可从5'→3'聚合RNA。

原核生物中的RNA聚合酶全酶由五个亚基构成，即α2ββ'σ。σ亚基与转录起始点的识别有关，而在转录合成开始后被释放，余下的部分（α2ββ'）被称为核心酶，与RNA链的聚合有关。

真核生物中的RNA聚合酶分为三种：RNA polⅠ存在于核仁，对α-鹅膏蕈碱不敏感，用于合成rRNA前体；RNA polⅡ存在于核基质，对α-鹅膏蕈碱极敏感，用于合成HnRNA；RNA polⅢ存在于核基质，对α-鹅膏蕈碱敏感，用于合成tRNA前体、snRNA及5S rRNA。

4．终止因子ρ蛋白：这是一种六聚体的蛋白质，能识别终止信号，并能与RNA紧密结合，导致RNA的释放。

5．激活因子：降解产物基因激活蛋白（CAP），又称为cAMP受体蛋白（CRP），是一种二聚体蛋白质。该蛋白与cAMP结合后，刺激RNA聚合酶与起始部位结合，从而起始转录过程。

三、RNA转录合成的基本过程：

1．识别：RNA聚合酶中的σ因子识别转录起始点，并促使核心酶结合形成全酶复合物。

位于基因上游，与RNA聚合酶识别、结合并起始转录有关的一些DNA顺序称为启动子。在原核生物中的启动子通常长约60bp，存在两段带共性的顺序，即5'-TTGACA-3'和5'-TATAATG-3'，其中富含TA的顺序被称为Pribnow盒。真核生物的启动子中也存在一段富含TA的顺序，被称为Hogness盒或TATA盒。

2．起始：RNA聚合酶全酶促使局部双链解开，并催化ATP或GTP与另外一个三磷酸核苷聚合，形成第一个3',5'-磷酸二酯键。

3．延长：σ因子从全酶上脱离，余下的核心酶继续沿DNA链移动，按照碱基互补原则，不断聚合RNA。

4．终止：RNA转录合成的终止机制有两种。

⑴自动终止：模板DNA链在接近转录终止点处存在相连的富含GC和AT的区域，使RNA转录产物形成寡聚U及发夹形的二级结构，引起RNA聚合酶变构及移动停止，导致RNA转录的终止。

⑵依赖辅助因子的终止：由终止因子（ρ蛋白）识别特异的终止信号，并促使RNA的释放。

四、真核生物RNA转录后的加工修饰：

1．mRNA的转录后加工：

⑴加帽：即在mRNA的5'-端加上m7GTP的结构。此过程发生在细胞核内，即对HnRNA进行加帽。加工过程首先是在磷酸酶的作用下，将5'-端的磷酸基水解，然后再加上鸟苷三磷酸，形成GpppN的结构，再对G进行甲基化。

⑵加尾：这一过程也是细胞核内完成，首先由核酸外切酶切去3'-端一些过剩的核苷酸，然后再加入polyA。

⑶剪接：真核生物中的结构基因基本上都是断裂基因。结构基因中能够指导多肽链合成的编码顺序被称为外显子，而不能指导多肽链合成的非编码顺序就被称为内含子。真核生物HnRNA的剪接一般需snRNA参与构成的核蛋白体参加，通过形成套索状结构而将内含子切除掉。 ⑷内部甲基化：由甲基化酶催化，对某些碱基进行甲基化处理。

2．tRNA的转录后加工： 主要加工方式是切断和碱基修饰。

3．rRNA的转录后加工： 主要加工方式是切断。

**第十二章、蛋白质生物合成**

生物体内的各种蛋白质都是生物体利用约20种氨基酸为原料自行合成的。蛋白质的生物合成过程，就是将DNA传递给mRNA的遗传信息，再具体的解译为蛋白质中氨基酸排列顺序的过程，这一过程被称为翻译（translation)。参与蛋白质生物合成的各种因素构成了蛋白质合成体系，该体系包括：

1.mRNA：作为指导蛋白质生物合成的模板。

mRNA中每三个相邻的核苷酸组成三联体，代表一个氨基酸的信息，此三联体就称为MM。共有64种不同的MM。遗传MM具有以下特点：① 连续性；② 简并性；③ 通用性；④ 方向性；⑤ 摆动性；⑥ 起始MM：AUG；终止MM：UAA、UAG、UGA。

2.tRNA：在氨基酸tRNA合成酶催化下，特定的tRNA可与相应的氨基酸结合，生成氨基酰tRNA，从而携带氨基酸参与蛋白质的生物合成。

tRNA反MM环中部的三个核苷酸构成三联体，可以识别mRNA上相应的MM，此三联体就称为反MM。 反MM对MM的识别，通常也是根据碱基互补原则，即A—U，G—C配对。但反MM的第一个核苷酸与第三核苷酸之间的配对，并不严格遵循碱基互补原则，这种配对称为不稳定配对。

能够识别mRNA中5′端起动MMAUG的tRNA称为起动tRNA。在原核生物中，起动tRNA是tRNAfmet；而在真核生物中，起动tRNA是tRNAmet。

3．rRNA和核蛋白体：原核生物中的核蛋白体大小为70S，可分为30S小亚基和50S大亚基。真核生物中的核蛋白体大小为80S，也分为40S小亚基和60S大亚基。核蛋白体的大、小亚基分别有不同的功能：

⑴小亚基：可与mRNA、GTP和起动tRNA结合。

⑵大亚基：①具有两个不同的tRNA结合点。A位—— 受位或氨酰基位，可与新进入的氨基酰tRNA结合；P位——给位或肽酰基位，可与延伸中的肽酰基tRNA结合。②具有转肽酶活性。

在蛋白质生物合成过程中，常常由若干核蛋白体结合在同一mRNA分子上，同时进行翻译。由若干核蛋白体结合在一条mRNA上同时进行多肽链的翻译所形成的念球状结构称为多核蛋白体。

4．起动因子（IF）：这是一些与多肽链合成起动有关的蛋白因子。原核生物中存在3种起动因子，分别称为IF1-3。在真核生物中存在9种起动因子（eIF）。其作用主要是促进核蛋白体小亚基与起动tRNA及模板mRNA结合。

5．延长因子（EF）：原核生物中存在3种延长因子（EFTU，EFTS，EFG），真核生物中存在2种（EF1，EF2）。其作用主要促使氨基酰tRNA进入核蛋白的受体，并可促进移位过程。

6．释放因子（RF）：原核生物中有4种，在真核生物中只有1种。其主要作用是识别终止MM，协助多肽链的释放。

7．氨基酰tRNA合成酶：该酶存在于胞液中，与特异氨基酸的活化以及氨基酰tRNA的合成有关。每种氨基酰tRNA合成酶对相应氨基酸以及携带氨基酸的数种tRNA具有高度特异性。

二、蛋白质生物合成过程：

1．氨基酸的活化与搬运：氨基酸的活化以及活化氨基酸与tRNA的结合，均由氨基酰tRNA合成酶催化完成。反应完成后，特异的tRNA3’端CCA上的2’或3’位自由羟基与相应的活化氨基酸以酯键相连接，形成氨基酰tRNA。

2．活化氨基酸的缩合——核蛋白体循环：活化氨基酸在核蛋白体上反复翻译mRNA上的MM并缩合生成多肽链的循环反应过程，称为核蛋白体循环。核蛋白体循环过程可分为三个阶段：

⑴起动阶段：①30S起动复合物的形成。在IF促进下，30S小亚基与mRNA的起动部位，起动tRNA（tRNAfmet），和GTP结合，形成复合体。②70S起动前复合体的形成。IF3从30S起动复合体上脱落，50S大亚基与复合体结合，形成70S起动前复合体。③70S起动复合体的形成。GTP被水解，IF1和IF2从复合物上脱落。

⑵肽链延长阶段：①进位：与mRNA下一个MM相对应的氨基酰tRNA进入核蛋白体的受位。此步骤需GTP，Mg2+，和EF参与。②成肽：在转肽酶的催化下，将给位上的tRNA所携带的甲酰蛋氨酰基或肽酰基转移到受位上的氨基酰tRNA上，与其α-氨基缩合形成肽键。给位上已失去蛋氨酰基或肽酰基的tRNA从核蛋白上脱落。③移位：核蛋白体向mRNA的3'- 端滑动相当于一个MM的距离，同时使肽酰基tRNA从受体移到给位。此步骤需EF（EFG）、GTP和Mg2+参与。 此时，核蛋白体的受位留空，与下一个MM相对应的氨基酰tRNA即可再进入，重复以上循环过程，使多肽链不断延长。

⑶肽链终止阶段：核蛋白体沿mRNA链滑动，不断使多肽链延长，直到终止信号进入受位。①识别：RF识别终止MM，进入核蛋白体的受位。②水解：RF使转肽酶变为水解酶，多肽链与tRNA之间的酯键被水解，多肽链释放。③解离：通过水解GTP，使核蛋白体与mRNA分离，tRNA、RF脱落，核蛋白体解离为大、小亚基。

三、多肽链合成后的加工修饰：

1．一级结构的加工修饰：

⑴N端甲酰蛋氨酸或蛋氨酸的切除：N端甲酰蛋氨酸是多肽链合成的起始氨基酸，必须在多肽链折迭成一定的空间结构之前被切除。其过程是：① 去甲酰化；② 去蛋氨酰基。

⑵氨基酸的修饰：由专一性的酶催化进行修饰，包括糖基化、羟基化、磷酸化、甲酰化等。

⑶二硫键的形成：由专一性的氧化酶催化，将-SH氧化为-S-S-。

⑷肽段的切除：由专一性的蛋白酶催化，将部分肽段切除。

2．高级结构的形成：

⑴构象的形成：在分子内伴侣、辅助酶及分子伴侣的协助下，形成特定的空间构象。

⑵亚基的聚合。 ⑶辅基的连接。

3．靶向输送：蛋白质合成后，定向地被输送到其执行功能的场所称为靶向输送。大多数情况下，被输送的蛋白质分子需穿过膜性结构，才能到达特定的地点。因此，在这些蛋白质分子的氨基端，一般都带有一段疏水的肽段，称为信号肽。分泌型蛋白质的定向输送，就是靠信号肽与胞浆中的信号肽识别粒子（SRP）识别并特异结合，然后再通过SRP与膜上的对接蛋白（DP）识别并结合后，将所携带的蛋白质送出细胞。

**第十三章 基因表达调控**

一、基因表达调控基本概念与原理：

1．基因表达的概念：基因表达（gene expression）就是指在一定调节因素的作用下，DNA分子上特定的基因被激活并转录生成特定的RNA，或由此引起特异性蛋白质合成的过程。

2．基因表达的时间性及空间性：

⑴时间特异性：基因表达的时间特异性(temporal specificity)是指特定基因的表达严格按照特定的时间顺序发生，以适应细胞或个体特定分化、发育阶段的需要。故又称为阶段特异性。

⑵空间特异性：基因表达的空间特异性（spatial specificity）是指多细胞生物个体在某一特定生长发育阶段，同一基因的表达在不同的细胞或组织器官不同，从而导致特异性的蛋白质分布于不同的细胞或组织器官。故又称为细胞特异性或组织特异性。

3．基因表达的方式：

⑴组成性表达：组成性基因表达（constitutive gene expression）是指在个体发育的任一阶段都能在大多数细胞中持续进行的基因表达。其基因表达产物通常是对生命过程必需的或必不可少的，且较少受环境因素的影响。这类基因通常被称为管家基因（housekeeping gene）。

⑵诱导和阻遏表达：诱导表达（induction）是指在特定环境因素刺激下，基因被激活，从而使基因的表达产物增加。这类基因称为可诱导基因。阻遏表达（repression）是指在特定环境因素刺激下，基因被抑制，从而使基因的表达产物减少。这类基因称为可阻遏基因。

4．基因表达的生物学意义：①适应环境、维持生长和增殖。②维持个体发育与分化。

5．基因表达调控的基本原理：

⑴基因表达的多级调控：基因表达调控可见于从基因激活到蛋白质生物合成的各个阶段，因此基因表达的调控可分为转录水平（基因激活及转录起始），转录后水平（加工及转运），翻译水平及翻译后水平，但以转录水平的基因表达调控最重要。

⑵基因转录激活调节基本要素：①顺式作用元件：顺式作用元件（cis-acting element）又称分子内作用元件，指存在于DNA分子上的一些与基因转录调控有关的特殊顺序。②反式作用因子：反式作用因子（trans-acting factor）又称为分子间作用因子，指一些与基因表达调控有关的蛋白质因子。反式作用因子与顺式作用元件之间的共同作用，才能够达到对特定基因进行调控的目的。③顺式作用元件与反式作用因子之间的相互作用：大多数调节蛋白在与DNA结合之前，需先通过蛋白质-蛋白质相互作用，形成二聚体或多聚体，然后再通过识别特定的顺式作用元件，而与DNA分子结合。这种结合通常是非共价键结合。

二、操纵子的结构与功能：

在原核生物中，若干结构基因可串联在一起，其表达受到同一调控系统的调控，这种基因的组织形式称为操纵子。典型的操纵子可分为控制区和信息区两部分。信息区由一个或数个结构基因串联在一起组成；控制区通常由调节基因（阻抑蛋白编码基因）、启动基因（CRP和RNA聚合酶结合区）和操纵基因（阻抑蛋白结合位点）构成。

1．原核生物乳糖操纵子：

原核生物乳糖操纵子(Lac operon)的控制区包括调节基因，启动基因（其CRP结合位点位于RNA聚合酶结合位点上游）和操纵基因；其信息区由β-半乳糖苷酶基因（lacZ），通透酶基因（lacY）和乙酰化酶基因（lacA）串联在一起构成。当培养基中乳糖浓度升高而葡萄糖浓度降低时，乳糖作为诱导剂与阻抑蛋白结合，促使阻抑蛋白与操纵基因分离；另一方面，细胞中cAMP浓度升高，cAMP与CRP结合并使之激活，CRP与启动基因结合并促使RNA聚合酶与启动基因结合，基因转录激活。

2．原核生物色氨酸操纵子：

色氨酸操纵子（trp operon）属于阻遏型操纵子，主要调控一系列用于色氨酸合成代谢的酶蛋白的转录合成。色氨酸操纵子通常处于开放状态，其辅阻遏蛋白不能与操纵基因结合而阻遏转录。而当色氨酸合成过多时，色氨酸作为辅阻遏物与辅阻遏蛋白结合而形成阻遏蛋白，后者与操纵基因结合而使基因转录关闭。色氨酸操纵子的调控还涉及转录衰减(attenuation)机制。即在色氨酸操纵子第一个结构基因与启动基因之间存在有一衰减区域，当细胞内色氨酸酸浓度很高时，通过与转录相偶联的翻译过程，形成一个衰减子结构，使RNA聚合酶从DNA上脱落，导致转录终止。

3．原核生物转录的整体调控模式：

由成群的操纵子组成的基因转录调控网络称为调节子。通过组成调节子调控网络，对若干操纵子及若干蛋白质的合成进行协同调控，从而达到整体调控的目的。典型的整体调控模式是SOS反应，这是由一组与DNA损伤修复有关的酶和蛋白质基因组成。在正常情况下，这些基因均被LexA阻遏蛋白封闭。当有紫外线照射时，细菌体内的RecA蛋白水解酶被激活，催化LexA阻遏蛋白裂解失活，从而导致与DNA损伤修复有关的基因表达。

三、真核基因组结构特点：

1．转录产物为单顺反子：真核基因的转录产物一般是单顺反子（mono-cistron），即一个编码基因转录生成一个mRNA分子，并指导翻译一条多肽链。

2．大量重复序列：真核基因组中含大量的重复序列，这些重复序列大部分是没有特定生物学功能的DNA片段，可占整个基因组DNA的90%。根据重复频率可将其分为高度重复序列、中度重复序列和单拷贝序列。

3．断裂基因：真核生物中的基因具有不连续性，即一个基因的编码序列往往被一些非编码序列分隔开。基因中能够转录并进一步编码多肽链合成的部分称为外显子（exon），而在转录后会被剪除的部分则称为内含子（intron）。

三、真核基因表达调控的特点：

1．RNA聚合酶活性受转录因子调控：真核生物中存在RNA polⅠ、Ⅱ、Ⅲ三种不同的RNA聚合酶，分别负责转录不同的RNA。这些RNA聚合酶与相应的转录因子形成复合体，从而激活或抑制该酶的催化活性。

2．染色质结构改变参与基因表达的调控：真核生物DNA与组蛋白结合并形成核小体的结构，再进一步形成染色质。当真核基因被激活时，染色质的结构也随之发生改变。主要的改变有：

⑴单链DNA形成：基因被激活后，双链DNA解开成单链以利于转录，从而形成一些对DNAaseⅠ的超敏位点。

⑵DNA拓朴结构改变：天然双链DNA均以负性超螺旋构象存在，当基因激活后，则转录区前方的DNA拓朴结构变为正性超螺旋。正性超螺旋可阻碍核小体形成，并促进组蛋白解聚。

⑶核小体不稳定性增加：由于组蛋白修饰状态改变，巯基暴露等原因而引起核小体结构改变。

4．正性调节占主导：真核基因一般都处于阻遏状态，RNA聚合酶对启动子的亲和力很低。通过利用各种转录因子正性激活RNA聚合酶是真核基因调控的主要机制。

5．转录和翻译过程分别进行：转录与翻译过程分别存在于不同的亚细胞部位，可分别进行调控。

6．转录后加工修饰过程复杂：特别是mRNA，转录后仅形成其初级转录产物——HnRNA，然后再经剪接、加帽、加尾等加工修饰，才能转变为成熟的mRNA。

四、真核基因转录调控元件及激活机制：

1．顺式作用元件（分子内作用元件）：

⑴启动子：存在于结构基因上游，与基因转录启动有关的一段特殊DNA顺序称为启动子。与原核生物类似，也含有一段富含TATA的顺序，称为TATA盒。除此之外，还可见CAAT盒和GC盒。

⑵增强子：位于结构基因附近，能够增强该基因转录活性的一段DNA顺序称为增强子。增强子的特点是：①在转录起始点5’或3’侧均能起作用；②相对于启动子的任一指向均能起作用；③发挥作用与受控基因的远近距离相对无关；④对异源性启动子也能发挥作用；⑤通常具有一些短的重复顺序。

⑶沉默子：能够对基因转录起阻遏作用的DNA片段，属于负性调控元件。

2．反式作用因子（分子间作用因子）：真核生物反式作用因子通常属于转录因子（transcription factor，TF）。

(1)转录因子的种类：①非特异性转录因子（基本转录因子）：非选择性调控基因转录表达的蛋白质因子称为非特异性转录因子。真核生物中存在的三种RNA聚合酶分别有相应的转录因子，即TFⅠ，TFⅡ，TFⅢ。其中，TFⅡ一共有六种亚类。TFⅡD是唯一能识别启动子TATA盒并与之结合的转录因子，而TFⅡB则可促进聚合酶Ⅱ与启动子的结合。②特异性转录因子：能够选择性调控某种或某些基因转录表达的蛋白质因子称为特异性转录因子。目前较清楚的是调控免疫球蛋白基因表达的核内蛋白质因子（NF）。

(2)转录因子的结构：反式作用因子至少含有三个功能域，即DNA结合功能域，转录活性功能域和其它转录因子结合功能域。DNA结合功能域带共性的结构主要有：①HTH和HLH结构： 由两段α-螺旋夹一段β-折迭构成，α-螺旋与β-折迭之间通过β-转角或成环连接，即螺旋-转角-螺旋结构和螺旋-环-螺旋结构。②锌指结构：见于TFⅢA和类固醇激素受体中，由一段富含半胱氨酸的多肽链构成。每四个半光氨酸残基或His残基螯合一分子Zn2+，其余约12-13个残基则呈指样突出，刚好能嵌入DNA双螺旋的大沟中而与之相结合。③亮氨酸拉链结构：见于真核生物DNA结合蛋白的C端，与癌基因表达调控有关。由两段α-螺旋平行排列构成，其α-螺旋中存在每隔7个残基规律性排列的Leu残基，Leu侧链交替排列而呈拉链状。两条肽链呈钳状与DNA相结合。

⑶转录因子的作用特点：①同一DNA顺式作用元件可被不同的转录因子所识别；②同一转录因子也可识别不同的DNA顺式作用元件；③TF与TF之间存在相互作用；④当TF与TF，TF与DNA结合时，可导致构象改变；⑤TF在合成过程中，有较大的可变性和可塑性。

3．转录激活及其调控：真核RNA聚合酶Ⅱ的激活需要依赖多种转录因子，并与之形成复合体。其过程首先是由TFⅡD识别启动子序列并与之结合；继而RNA聚合酶Ⅱ与TFⅡD、B等聚合形成一个功能性的前起始复合体——PIC；最后，结合了增强子的转录因子与前起始复合体结合，从而形成稳定的转录起始复合体。

**第十四章 基因重组和基因工程**

一、自然界的基因转移和重组：

基因重组(gene recombination)是指DNA片段在细胞内、细胞间，甚至在不同物种之间进行交换，交换后的片段仍然具有复制和表达的功能。

1．接合作用：当细胞与细胞相互接触时，DNA分子即从一个细胞向另一个细胞转移，这种遗传物质的转移方式称为接合作用（conjugation）。

2．转化和转染：由外来DNA引起生物体遗传性状改变的过程称为转化(transformation)。噬菌体常常可感染细菌并将其DNA注入细菌体内，也可引起细菌遗传性状的改变。通过感染方式将外来DNA引入宿主细胞，并导致宿主细胞遗传性状改变的过程称为转染(transfection)。转染是转化的一种特殊形式。

3．整合和转导:外来DNA侵入宿主细胞，并与宿主细胞DNA进行重组，成为宿主细胞DNA的一部分，这一过程称为整合。整合在宿主细胞染色体DNA中的外来DNA，可以被切离出来，同时也可带走一部分的宿主DNA，这一过程称为转导(transduction)。来源于宿主DNA的基因称为转导基因。

4．转座：转座又称为转位（transposition），是指DNA的片段或基因从基因组的一个位置转移到另一个位置的现象。这些能够在基因组中自由游动的DNA片段包括插入序列和转座子两种类型。

⑴插入序列：典型的插入序列（insertion sequence，IS）是长750-1500bp的DNA片段，由两个分离的反向重复序列和一个转座酶基因。当转座酶基因表达时，即可引起该序列的转座。其转座方式主要有保守性转座和复制性转座。

⑵转座子：转座子(transposons)是可从一个染色体位点转移到另一个位点的分散的重复序列，含两个反向重复序列、一个转座酶基因和其他基因（如抗生素抗性基因）。

免疫球蛋白重链基因由一组可变区基因（VH）和一组恒定区基因（CH）构成，通过这些基因的选择性转座和重组，就可以转录表达出各种各样的免疫球蛋白重链，以对付不同的抗原。

5．基因重组的方式：

⑴位点特异性重组：在整合酶的催化下，两段DNA序列的特异的位点处发生整合并共价连接，称为位点特异性重组。

⑵同源重组：发生在同源DNA序列之间的重组称为同源重组(homologous recombination)。这种重组方式要求两段DNA序列类似，并在特定的重组蛋白或酶的作用下完成。

二、重组DNA技术：

重组DNA技术又称为基因工程（genetic engineering）或分子克隆(molecular cloning)，是指采用人工方法将不同来源的DNA进行重组，并将重组后的DNA引入宿主细胞中进行增殖或表达的过程。

1．载体和目的基因的分离（分）：对载体DNA和目的基因分别进行分离纯化，得到其纯品。

⑴载体：常用的载体(vector)主要包括质粒(plasmid)、噬菌体(phage)和病毒(virus)三大类。这些载体均需经人工构建，除去致病基因，并赋予一些新的功能，如有利于进行筛选的标志基因、单一的限制酶切点等。①质粒：是存在于天然细菌体内的一种独立于细菌染色体之外的双链环状DNA，具有独立复制的能力，通常带有细菌的抗药基因。②噬菌体：可通过转染方式将其DNA送入细菌体内进行增殖。常用的为人工构建的λ噬菌体载体，当目的基因与噬菌体DNA进行重组时，可采用插入重组方式，也可采用置换重组方式。③病毒：常用的为SV40，通过感染方式将其DNA送入哺乳动物细胞中进行增殖。

⑵目的基因：①直接从染色体DNA中分离：仅适用于原核生物基因的分离。②人工合成：根据已知多肽链的氨基酸顺序，利用遗传MM表推定其核苷酸顺序再进行人工合成。适应于编码小分子多肽的基因。③从mRNA合成cDNA：采用一定的方法钓取特定基因的mRNA，再通过逆转录酶催化合成其互补DNA（cDNA），除去RNA链后，再用DNA聚合酶合成其互补DNA链，从而得到双链DNA。④从基因文库中筛选：将某一种基因DNA用适当的限制酶切断后，与载体DNA重组，再全部转化宿主细胞，得到含全部基因组DNA的种群，称为G文库(genomic DNA library)。将某种细胞的全部mRNA通过逆转合成cDNA，然后转化宿主细胞，得到含全部表达基因的种群，称为C-文库(cDNA library)。C-文库具有组织细胞特异性。⑤利用PCR合成：如已知目的基因两端的序列，则可采用聚合酶链反应（polymerase chain reaction, PCR）技术，在体外合成目的基因。

2．载体和目的基因的切断（切）：通常采用限制性核酸内切酶(restriction endonuclease)，简称限制酶，分别对载体DNA和目的基因进行切断，以便于重组。能够识别特定的碱基顺序并在特定的位点降解核酸的核酸内切酶称为限制酶。限制酶所识别的顺序往往为4-8个碱基对，且有回文结构。由限制酶切断后的末端可形成平端、3'-突出粘性末端和5'-突出粘性末端三种情况。形成粘性末端(cohesive end)者较有利于载体DNA和目的基因的重组。

3．载体和目的基因的重组（接）：即将带有切口的载体与所获得的目的基因连接起来，得到重新组合后的DNA分子。

⑴粘性末端连接法：载体与目的基因通过粘性末端进行互补粘合，再加入DNA连接酶，即可封闭其缺口，得到重组体。

⑵人工接尾法：即同聚物加尾连接法。在末端核苷酸转移酶的催化下，将脱氧核糖核苷酸添加于载体或目的基因的3'-端，如载体上添加一段polyG，则可在目的基因上添加一段polyC，通过碱基互补进行粘合后，再由DNA连接酶连接。

⑶人工接头连接法：将人工连接器（即一段含有多种限制酶切点的DNA片段）连接到载体和目的基因上，即有可能使用同一种限制酶对载体和目的基因进行切断，得到可以互补的粘性末端。

4．重组DNA的转化和扩增（转）：将重组DNA导入宿主细胞进行增殖或表达。重组质粒可通过转化方式导入宿主细胞，λ噬菌体作为载体的重组体，则需通过转染方式将重组噬菌体DNA导入大肠杆菌等宿主细胞。重组DNA导入宿主细胞后，即可在适当的培养条件下进行培养以扩增宿主细胞。

5．重组DNA的筛选和鉴定（筛）：对含有重组体的宿主细胞进行筛选并作鉴定。

⑴根据重组体的表型进行筛选：对于带有抗药基因的质粒重组体，可采用插入灭活法进行筛选。

⑵根据标志互补进行筛选：当宿主细胞存在某种基因及其表达产物的缺陷时，可采用此方法筛选重组体。即在载体DNA分子中插入相应的缺陷基因，如宿主细胞重新获得缺陷基因的表达产物，则说明该细胞中带有重组体。

⑶根据DNA限制酶谱进行分析：经过粗筛后的含重组体的细菌，还需进行限制酶谱分析进一步鉴定。

⑷用核酸杂交法进行分析鉴定：采用与目的基因部分互补的DNA片段作为探针，与含有重组体的细菌菌落进行杂交，以确定重组体中带目的基因。

获得带目的基因的细菌后，可将其不断进行增殖，从而得到大量的目的基因片段用于分析研究。如在目的基因的上游带有启动子顺序，则目的基因还可转录表达合成蛋白质。